

Über das Glutathion und verwandte Redoxsysteme

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

PETER LUTHE
aus Mittweida

Marburg 1974

Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg an der Lahn

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. STRAUB

Über das Glutathion und verwandte Redoxsysteme

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

PETER LUTHE
aus Mittweida

Marburg 1974

Druck: Georg Nolte, Marburg, Biegenstraße 5



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 18.1.1974

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Humanmedizin

Dekan : Prof. Dr. med. Oepen
Referent : Prof. Dr. med. Reim
Correferent : Prof. Dr. med. dent. Schnell

INHALTSVERZEICHNIS:

	Seite
I. EINLEITUNG	1
1. Anatomischer Aufbau der Hornhaut	1
2. Biochemie und Physiologie der Hornhaut	4
II. FRAGESTELLUNG UND PLAN DER UNTERSUCHUNGEN	8
III. METHODISCHER TEIL	9
1. Die verwandten Geräte und Reagentien	9
2. Gewinnung des Materials	10
3. Allgemeine Grundlagen der verwandten Bestimmungsmethoden	12
4. Bestimmungsmethoden	14
a) Bestimmung von GSH und GSSG	14
1. Herstellung des Extraktes	14
2. Testvorschriften	15
b) Bestimmung von NADPH	17
1. Herstellung des Extraktes	17
2. Zusammensetzung der Lösungen	17
3. Testvorschriften	18
c) Bestimmung von G-6-P, 6-PG und NADP	19
1. Herstellung des Extraktes	19
2. Testvorschriften	19
d) Bestimmung von ASC und DHA und H_2O_2	21
1. Herstellung des Extraktes	21
2. Photometrische ASC-Bestimmung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin	21
3. Zusammensetzung der Lösungen	23
4. Photometrische ASC-Bestimmung mit 2-6-Dichlorphenolindophenol	24
5. Berechnung der Einzelwerte	24
6. Die statistische Auswertung der Ergebnisse	25

IV.	ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG	27
	1. Bestimmung von Metaboliten im Epithel, Stroma und Endothel der Cornea sowie des Kammerwassers von Rinderaugen	27
	2. Vergleich unserer Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur	29
V.	DISKUSSION	33
	1. Methodische Betrachtungen	33
	a) Corneaepithel	33
	1. GSH / GSSG	33
	2. Ascorbinsäure / Dehydroascorbinsäure	37
	3. NADP / NADPH	39
	4. G-6-P und 6-PG	39
	b) Corneastroma	40
	c) Kammerwasser	40
	2. Das Glutathion- / Hexosephosphat-System	41
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	49
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	50

Methodischer Anhang

Verzeichnis der Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ASC	Ascorbinsäure
ASC _{ges}	Gesamtascorbinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
DHA	Dehydroascorbinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
F-6-P	Fructose-6-phosphat
Gl I	Glyoxalase I
G-6-P	Glucose-6-phosphat
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxydiert
MgCl	Magnesiumchlorid
MGO	Methylglyoxal
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, oxydiert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert
6-PG	6-Phosphogluconat
6-PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
R-5-P	Ribulose-5-phosphat
TRAP	Triäthanolamin-Hydrochlorid
ZF	Zwischenferment = G-6-PDH Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

I. EINLEITUNG

1. Anatomischer Aufbau der Hornhaut

Die Hornhaut des Auges hat viele Aufgaben zu erfüllen, denen sie nur durch Spezialisierung in Aufbau und Funktion gerecht werden kann. Einerseits widersteht sie durch ihren Aufbau dem intraokularen Druck und bietet durch ihre besondere Lage Schutz vor mechanischen Alterationen der Umwelt. Andererseits ist sie ein wichtiger Bestandteil des optischen Systems des Auges. Dafür müssen alle Bedingungen zur Übertragung getreuer Bilder der Umwelt vorhanden sein. Gleichbleibende Dicke, Krümmung und Transparenz sind Voraussetzungen dafür. Diese Eigenschaften werden durch die Kombination der anatomischen Struktur mit speziellen physiologischen und physiologisch-chemischen Vorgängen erreicht.

Morphologisch besteht die Hornhaut aus fünf Schichten.

Sie werden in a) Epithel

b) BOWMANSche Membran

c) Stroma

d) Descemet'sche Membran

e) Endothel

unterteilt und sollen auch in dieser Reihenfolge besprochen werden.

a) Hornhautepithel

Das Epithel der Hornhaut ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, das aus 5 - 8 Zellschichten besteht. Es hat eine eigene ihm zugehörige Basalmembran, auf der die kubisch bis zylindrisch strukturierten Basalzellen ruhen. Deren Cytoplasma ist stark anfärbbar, die Zellkerne sind kontrastreich und deutlich strukturiert (ROHEN). Elektronenmikroskopisch zeigen sie gut ausgebildete Zellorganellen im Plasma (JAKUS, TENG, PEDLER). Es finden sich fließende Übergänge von den Basalzellen über die runden Intermediär- oder Flügelzellen zu den abgeflachten Deckzellen (HANNA, O'BRIEN). Diese besitzen feinste cytoplasmatische Vorstülpungen, die für das Haften des Flüssigkeitsfilmes (AONO, PEDLER) und damit für eine glatte Oberfläche der Hornhaut notwendig sind. Das wiederum ist Voraussetzung für deren einwandfreie Brechkraft (MAURICE). Nach einer mittleren Lebensdauer von 3,5 - 7 Tagen werden die Deckzellen von der Oberfläche abgestoßen und durch neue ersetzt (HANNA, O'BRIEN). Die Regenerationszeit beträgt nach totaler Entfernung des Epithels beim Kaninchen ca. eine Woche (DUKE-ELDER).

b) Lamina limitans anterior (BOWMANsche Membran)

Die BOWMANsche Membran ist eine zellfreie modifizierte Stromaschicht, die sich färberisch und elektronenmikroskopisch deutlich vom Stroma und der Basalmembran des Epithels abgrenzen läßt. Ihr Vorkommen ist auf höhere Primaten beschränkt. Allerdings können auch beim Kaninchen Andeutungen einer zellfreien subepithelialen Zone nachgewiesen werden, die der BOWMANschen Membran in ihrem färberischen Verhalten gleicht (YAMAMATO, CALMETTES et al., TENG).

c) Hornhautstroma

Im Stroma findet sich als Grundlage eine kollagenfasrige Textur. Die Kollagenfaserbündel sind regelmäßig strukturiert und werden von fibrozytenähnlichen Stromazellen (VIRCHOW, ROHEN) und elastischen Netzen begleitet. Es finden sich auch polymorphkernige Leukozyten (VIRCHOW, WEIMAR). Die Grundsubstanz zwischen den kollagenen Fasern besteht aus sauren Mucopolysacchariden (SMELSER) - deren Hauptbestandteil das Keratosulfat bildet - und löslichen Proteinen. Letztere erzeugen den kolloid-osmotischen Druck und sorgen damit für die Hydratation der Cornea (MAURICE).

d) Lamina limitans posterior (Descemet'sche Membran)

Sie wird als 'hypertrophierte Basalmembran' des Endothels verstanden (ROHEN). Das elektronenmikroskopische Bild zeigt einen Aufbau aus übereinanderliegenden Lamellen, wobei in jeder Lamelle dunkle Knoten sichtbar sind. Die nebeneinanderliegenden Knoten sind durch Filamente verbunden, so daß eine regelmäßige, hexagonale Gitterstruktur entsteht (JAKUS).

e) Hornhautendothel

Das Endothel der Hornhaut ähnelt in seinem Aufbau sehr anderen Mesothelien, besonders dem des Peritoneums (KAYE). Es ist eine regelmäßig gebaute, einzellige Schicht polygonaler Zellen, die bedeutend mehr Mitochondrien enthalten als die des Epithels. Interzellularbrücken (Desmosomen) sind nicht vorhanden. Diese Zellen sind seitlich stark verzahnt und scheinen sich zur Basis hin zu berühren (JAKUS, DONN u. Mitarb.). Elektronenmikroskopisch konnten ein aktiver Flüssigkeitstransport durch pinocytotische Bläschen (STAUBESAND)

und die Diffusion zahlreicher Substrate (MAURICE) sowie kolloidaler Partikel (KAYE u. PAPPAS) erkannt werden.

f) Kammerwasser

Das Kammerwasser ist eine klare und farblose Flüssigkeit, welche den gleichen Brechungsindex hat wie Wasser. Es befindet sich ständig in Bewegung, da es durch seine Abkühlung an der Cornea ins Augeninnere herabsinkt und durch Erwärmung an der Iris wieder in die Höhe steigt. Damit sorgt es für die Zuführung und Verteilung nutritiver Metabolite. Der intraokulare Druck ist abhängig von dem Verhältnis, in dem die Menge des produzierten Kammerwassers und seine Abflußmöglichkeiten zueinander stehen.

2. Biochemie und Physiologie der Hornhaut

Die Besonderheiten des Stoffwechsels der Cornea sind durch das Fehlen von Blutgefäßen bedingt und bisher noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Es lassen sich in allen Schichten der Cornea Enzyme, Coenzyme und Substrate der Glykolyse, des Citronensäurecyclus und des Pentosephosphatcyclus nachweisen (DELBRÜCK, FÖRSTER, HERRMANN u. HICKMAN, LEINFELDER, REIM u. LICHTE, REIM u. MEYER, RILEY). Eine besondere Rolle im Stoffwechsel der Cornea spielt das Glutathion. Das Vorhandensein des Glutathions scheint im engen Zusammenhang mit der Transparenz der Cornea zu stehen. Glukose und reduziertes Glutathion wurden als essentielle Substrate für die Regelung der Hydratation der isolierten Cornea erkannt (DIKSTEIN u. MAURICE). Das steht im Einklang mit dem Nachweis einer hohen Konzentration an Glutathion (HERRMANN u. MOSES) und mit der Anwesenheit von Systemen für seine Synthese und seinen Abbau. KINSEY und MERRIAM zeigten, daß Linsen-

kulturen in vitro aus den drei Grundelementen Glycin, Glutaminsäure und Cystein Glutathion aufbauen können. Zu einer derartigen Synthese sind auch Linsenextrakte fähig, wenn Magnesiumionen und Adenosintriphosphat anwesend sind (DAISLEY). In der Cornea hat man noch nicht die Glutathionsynthese nachgewiesen. Gesichert ist die Rolle des Glutathions innerhalb enzymatischer Prozesse, die zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels der Cornea notwendig sind.

Glutathion-Reduktase, die zur Aufrechterhaltung der biologisch aktiven SH-Form des Glutathions notwendig ist, wurde in der Cornea mehrfach bestimmt (HENNIGHAUSEN). Eine Koppelung der Glutathion-Reduktase-Reaktion mit der oxydativen Decarboxylierung der Apfelsäure durch NADP haben VAN HEYNINGEN und PIRIE in vitro gezeigt. Die Bedeutung des Glutathions als wichtiger Bestandteil des Enzymkomplexes im EMBDEN-MEYERHOF Abbauweg wird durch den Nachweis der Beteiligung am Aufbau der Glyceroaldehydphosphatdehydrogenase unterstrichen (KRIMSKY u. RACKER), durch die Tripeptidverbindung wird außerdem die Glycerophosphatase aktiviert (NORDMANN, 1954). Wahrscheinlich gibt es in der Cornea, ähnlich wie in den Erythrozyten, ein System, durch das Glutathion in seiner reduzierten Form erhalten wird.

SCHEUCH und RAPOPORT nehmen einen direkten Zusammenhang zwischen Glutathion und der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels der Erythrozyten an. Dabei soll ein sich selbst stabilisierender Regelkreis bestehen, indem das Glutathion die SH-Gruppen der Enzyme Hexokinase, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glutathion-Reduktase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in ihrer Funktion erhält. Umgekehrt soll diese Enzymkette die SH-Form des Glutathions gewährleisten. Eine Elektronentransportkette, die eine Verbindung des Pentosephosphatcyclus über das Glutathion-Reduktase-System mit dem Ascorbinsäure-Redox-System herstellt, zeigten ANDERSON u. SPECTOR (1971).

Daraus ergibt sich ein vollständiger Nebenweg der Atmung in der Cornea. Denn bisher ist eine Glutathion-Dehydrogenase, die die Oxydation von reduziertem Glutathion durch Dehydroascorbinsäure katalysiert, nur in Pflanzen beschrieben worden. Nach NORDMANN sowie NORDMANN u. VERTRUYEN (1938) soll nicht dem Glutathion, sondern der Ascorbinsäure eine entscheidende Rolle in der Regulierung des Oxydo-reduktiven Gleichgewichts zukommen. In den Erythrozyten reduziert Ascorbinsäure auf indirektem Wege Methämoglobin zu Hämoglobin. Diese Wirkung beruht wahrscheinlich darauf, daß Ascorbinsäure an der Erythrozytenmembran Glutathion hydriert, das dann seinerseits Methämoglobin reduziert (WALLER, 1962). Bei Tintenstiftverletzungen des Auges entfärbt Ascorbinsäure Methylviolett (SCHIRMER, 1953). Auch bei Laugenverletzungen des Auges hat sich Ascorbinsäure als Neutralisationsmittel bewährt (KRUEGER, 1953).

Damit ist die Bedeutung der Ascorbinsäure nicht erschöpft. Vor allem scheint die Bildung und Erhaltung des Faserproteins Kollagen, aus dem sich das Hornhautstroma aufbaut, von einem normalen Ascorbinsäurespiegel abhängig zu sein (WOLBACH, 1933).

So findet man einen sehr hohen Ascorbinsäuregehalt im Auge, und zwar im Kammerwasser (MÜLLER, 1953). Daß auch die anderen Bestandteile des Auges hohe Ascorbinsäurekonzentrationen aufweisen, zeigten für die Retina SULLMANN u. SCHMIDT (1942), für den Glaskörper JOHNSON (1936), für den Ciliarkörper FRIEDENWALD, BUSCHKE u. MICHEL (1943) und für die Cornea PIRIE (1945).

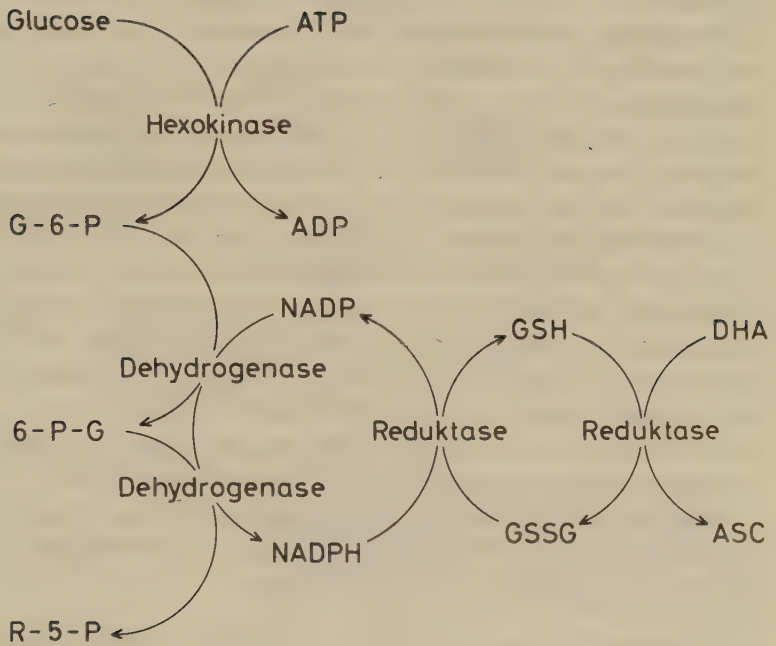


Abb. 1: Darstellung der möglichen Verbindung des Pentosephosphatcyclus über das Glutathion-Reduktase-System mit dem Ascorbinsäure-Redox-System.
(Modifiziert nach ANDERSON u. SPECTOR).

II. FRAGESTELLUNG UND PLAN DER UNTERSUCHUNGEN

Der aerobe Stoffwechsel der Cornea ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt. Es scheint gesichert, daß hier der Pentosephosphatcyclus eine große Rolle spielt (KINOSHITA, 1961). Im Corneaepithel finden sich erhebliche Mengen Ascorbinsäure und Glutathion. Uns erschien es deshalb von Bedeutung, die bisher publizierten Konzentrationen einiger Metabolite des Pentosephosphatcyclus, der Ascorbinsäure und des Glutathion, teilweise mittels anderer Methoden, zu überprüfen. Außerdem untersuchten wir die Konzentrationen der Dehydroascorbinsäure, des NADP und des NADPH. Wir fragten uns, ob die Verteilung der extra- und intrazellulären Metabolite in den einzelnen Corneaabschnitten und im Kammerwasser zum Verständnis von Oxydations- und Reduktionsvorgängen im Stoffwechsel der Cornea beitragen könnte. Aus diesem Grund versuchten wir, anhand der erhaltenen Werte, eine Beziehung zwischen dem Pentosephosphatcyclus, dem Glutathion-Reduktase-System und dem Ascorbinsäure-Redox-System herzustellen. Um eine Aussage über Reaktionen des Stoffwechsels und der Metabolitbewegungen zu treffen, bestimmten wir im Einzelnen:

im Hornhautepithel:	G-6-P, 6-PG, NADP, NADPH, GSH, GSSG, ASC, DHA,
im Hornhautstroma:	GSH, GSSG, ASC, DHA,
im Hornhautendothel:	GSH, GSSG,
im Kammerwasser:	ASC, DHA

Die Ergebnisse der Analysen an Rinderaugen werden erstens auf die Metabolitspiegel in den einzelnen Kompartimenten und zweitens auf die Reaktionspartner zueinander (Gleichgewichte) ausgewertet.

III. METHODISCHER TEIL

1. Die verwandten Geräte und Reagentien

Photometer Eppendorf: Fa. Netheler & Hinz;
Hamburg-Wellingsbüttel;
mit Registriereinrichtung und
Skalenspreizung

Photometer Beckman DK-2A:
Beckman Instruments, Inc.,
Fullerton; California / USA

Waage: Mettler, Typ H 16:
Fa. Spoerhase AG, Gießen

Cuvetten: Normalcuvetten; Schichtdicke $d = 1$
Halbmikrocuvetten; Schichtdicke $d = 2$
Halbmikrocuvetten; Schichtdicke $d = 5$

Zum Homogenisieren der Gewebeproben:
Glas-in-Glas-Homogenisator nach
POTTER-ELVEHJEM, Fa. Kobe, Marburg.
"Rühromag"-Universalrührer Typ RU 10;
Fa. F. Kurt Retsch, Haan (Rheinl.)

Wasseraufbereitungsanlage:
Fa. A. Lang, Zürich 47.
Das dadurch hergestellte ionenfreie
Wasser besaß einen Leitwiderstand
von mehr als 2 Meg. Ohm.

Kühlzentrifuge "Omicron":
Fa. Martin Christ, Osterode/Harz

Laborzentrifuge "Universal Junior III":
Fa. Martin Christ, Osterode/Harz

Pipetten: hauptsächlich benutzten wir "Eppendorf"-
Pipetten der Fa. Netheler & Hinz,
Mikrosystem "Marburg".

Einstabmeßkette LOT 405-M5:

Fa. Dr. W. Ingold KG,
Frankfurt/Main

Labor-pH-Meter Typ 13: Fa. Knick, Berlin 37

Die Reagentien für die Metabolitbestimmungen wurden
bis auf wenige Ausnahmen von der Fa. Boehringer GmbH.,
Mannheim, bezogen, die der Pufferlösungen von der
Fa. E. Merck, Darmstadt.

2. Gewinnung des Materials

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich an der Rindercornea vorgenommen. Dadurch konnte das Problem der geringen Gewebsmenge, welches durch den unterschiedlichen Charakter der benutzten Untersuchungsmethoden auftrat, gelöst werden. Durch die freundliche Unterstützung des Marburger Schlachthofdirektors, Dr. Dr. WANDT, sowie des Personals, erhielten wir die Rinderaugen kurz nach dem "Schießen" der Tiere.

Die enucleierten, noch im warmen Zustand befindlichen Bulbi spülten wir sofort mit physiologischer Na Cl-Lösung. Dadurch wurden etwa noch vorhandene Verunreinigungen der Corneaoberfläche beseitigt.

Der anschließende Transport wurde in einem verschließbaren Gefäß vorgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich die Hornhäute der Bulbi nicht gegenseitig berührten. Durch Verschließen des Gefäßes entstand eine feuchte Kammer.

a) Hornhautepithel

Das Epithel wurde durch Abrasio mit dem Hockey-Messer gewonnen. Die Abrasio erfolgte vom Limbus ausgehend zum Zentrum hin, wobei ein 1 bis 2 mm breiter Epithelstreifen am Limbus corneae nicht abradiert wurde. Dadurch wurde das Erfassen fremder Gewebe vermieden. Das Abradat ließen wir in flüssigen Stickstoff fallen.

b) Kammerwasser

Zur Gewinnung des Kammerwassers punktierten wir seitlich die Vorderkammer. Dabei wurde darauf geachtet, daß weder die Iris noch das Endothel verletzt wurden. Danach wurde das Kammerwasser bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigen Stickstoff eingefroren.

c) Hornhautendothel

Zur Gewinnung des Endothels schnitten wir die Hornhaut ungefähr 1 mm innerhalb des Limbus aus dem Bulbus heraus. Danach legten wir sie mit dem Endothel nach oben auf einen konvex geschliffenen Metallblock und schabten mit einem Hockey-Messer das Endothel ab. Das abradierte Endothel wurde danach sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

d) Hornhautstroma

Das nun vom Epithel und Endothel befreite Stroma wurde ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren und wie alle vorher gewonnenen Kompartimente der Rindercornea in einer Tiefkühltruhe bei ca. -20° C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Präparation der Cornea vom Zeitpunkt des Enucleierens bis zum Einfrieren dauerte pro Bulbus 30 bis 40 min.

Das Einfrieren unterblieb, wenn ASC oder DHA bestimmt werden sollte. Denn beide Stoffe wurden sofort, d. h. ohne Lagerung, bestimmt.

3. Allgemeine Grundlagen der verwandten Bestimmungs- methoden

Zur Bestimmung der ASC wurden zwei verschiedene spektrometrische Methoden verwendet. Die erste - nach A. PIRIE, 1964 - basiert auf einem Oxydations-Reduktionsverfahren, bei der die beiden locker gebundenen Wasserstoffatome der Endiol-Gruppierung der ASC oxydiert werden. Hierzu wurde als Oxydationsmittel 2,6-Dichlorphenolindophenol benutzt, das dabei zur Leucoform reduziert wird.

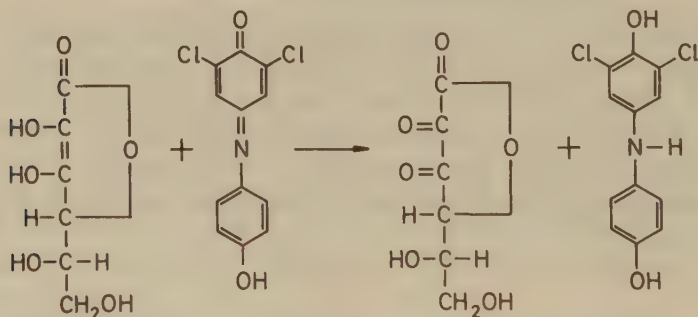


Abb. 2: Reaktionsprinzip

Die Bildung von Leuco-2,6-Dichlorphenolindophenol geht mit einer Farbänderung einher, die spektrometrisch zu erfassen und auszuwerten ist. Durch Zugabe von Peroxydase, die bei Anwesenheit von H_2O_2 eine Reoxydation von Leuco-2,6-Dichlorphenolindophenol und damit wiederum

eine spektrometrisch meßbare Farbänderung bewirkt, kann dieser Test auch zur quantitativen Bestimmung von H_2O_2 verwendet werden. Leider ist mit dieser Methode die DHA nicht nachweisbar. Außerdem wirken sich reduzierende Substanzen störend aus.

Deshalb wurde eine zweite, die Dinitrophenylhydrazin-Methode nach J.H. ROE u. C.A. KUETHER (1943) verwandt. Sie besitzt neben einer hohen Spezifität noch den Vorteil, daß mit ihr - neben ASC - auch DHA bestimmt werden kann.

Die ASC wird hierbei mittels 2,6-Dichlorphenolindophenol oxydiert. Die dadurch entstandene DHA reagiert mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin unter Bildung eines 2,4-Dinitrophenylhydrazons, das sich in hochprozentiger Schwefelsäure mit roter Farbe löst. Das Absorptionsmaximum liegt bei 520 - 525 nm.

Die Bestimmung der restlichen Metabolitkonzentrationen wurde mittels des enzymatisch-optischen Verfahrens nach WARBURG durchgeführt.

Die Testvolumina der Arbeitsvorschriften von H.-J. HOHORST, I.G. LEDER, M. KLINGENBERG, M.M. CIOTTI u. N.O. KAPLAN, H. KLOTZSCH u. H.-U. BERGMAYER wurden für die Cornea modifiziert.

4. Bestimmungsmethoden

a) Bestimmung von GSH und GSSG

1. Herstellung des Extraktes

Hornhautepithel:

Die in der Tiefkühltruhe aufbewahrten Epithelabradate wurden in 1 ml vorgekühlter 0,5 N HClO_4 aufgefangen und tauten in ihr auf. Die HClO_4 bewirkt sowohl die Fiweißfällung als auch die Spaltung der Enzyme. Unter Rührung in Eiswasser homogenisierten wir die Gewebe mit einem Glas-in-Glas-Homogenisator. Die Homogenisation betrug pro Epithel 10 min.; sie wurde mit der Laboruhr gestoppt. Die gewonnene milchig-weiße Lösung wurde 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand mit K_3PO_4 auf pH 7,0 gebracht. Nach erfolgter Neutralisation wurde der Extrakt nochmals 10 min zentrifugiert, jedoch bei 30.000 U/min und starker Kühlung, um das entstandene, schwerlösliche Perchlorat zu beseitigen. Der so gewonnene verhältnismäßig klare Überstand wurde sofort zur Test verwendet.

Hornhautendothel:

Mit dem Hornhautendothel wurde in gleicher Weise verfahren, wie oben für das Hornhautepithel beschrieben. Es mußten jedoch pro Glas-in-Glas-Homogenisator ca. 10 Endothelabradate verwendet werden, um einen günstigen Verdünnungsfaktor für das Gewebe zu erzielen.

Hornhautstroma:

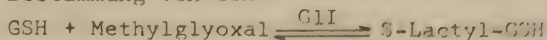
Auch die Extraktion des Hornhautstromas konnte, wie oben für das Hornhautepithel und -endothel beschrieben, durchgeführt werden. Jedoch mußte das Verfahren etwas abgeändert werden, um die Homogenisierung zu beschleunigen und die Herstellung eines ausreichend klaren Extraktes zu gewährleisten. Eine Beschleunigung wurde erzielt, indem wir der Homogenisierung im Glas-in-Glas-Homogenisator eine

grobe Zerkleinerung mittels eines Mörsers vorgeschaltet haben. Die grobe Zerkleinerung der Stomata im Mörser führten wir unter flüssigem Stickstoff durch.

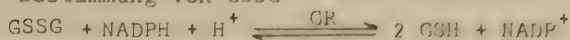
2. Testvorschriften

Reaktionen

(I) Bestimmung von GSH



(II) Bestimmung von GSSG



Reagentien

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 1. Phosphat-Lösung | 1,75 M K_3PO_4 |
| 2. Albumin-Lösung | ca. 1 % W/V |
| 3. GII-Lösung unverdünnt | |
| 4. GR-Lösung unverdünnt | |
| 5. Methylglyoxal-Lösung (MGO) | ca. 0,1 M
(1 : 5 verdünnt) |
| 6. NADPH-Lösung | 11 mM c = 10 |

Testzusammensetzung

	Probe			Leerwert		
(I)	0,5	ml	Extrakt	0,5	ml	Extrakt
	1,0	ml	aqua dest.	1,0	ml	aqua dest.
	0,05	ml	Albumin	0,05	ml	Albumin
	0,005	ml	GII			

Start 0,01 MGO

Nachstart 0,01 MGO

(II) 0,02 ml NADPH

Start 0,005 GR

Wellenlänge 240 nm (GSH-Bestimmung)

Wellenlänge 340 nm (GSSG-Bestimmung)

Temperatur 25°C

Normalcuvette d = 1

Messung gegen Leerwert

b) Bestimmung von NADPH

1. Herstellung des Extraktes

In einem Glas-in-Glas-Homogenisator wurden 2,5 ml alkoholische KOH-Lösung (1) in einer Eis-Kochsalzlösung auf ca. -17° C abgekühlt. In diese gekühlte alkoholische KOH wurden die in der Tiefkühltruhe aufbewahrten Epithelien eingebracht. Und zwar pro Glas-in-Glas-Homogenisator 3 Epithelien, was nach unseren Untersuchungen den günstigsten Verdünnungsfaktor ergab. Die Homogenisation des Gewebes wurde unter ständigem Kühlen im Eisbad vorgenommen. Dabei betrug die Dauer der Homogenisation 10 min und wurde mit der Laboruhr gestoppt. Danach wurden die Glas-in-Glas-Homogenisatoren durch einen Glasstopfen verschlossen und 5 min in einem 90° C Wasserbad geschüttelt. Daran anschließend wurden sie in einem Eisbad möglichst schnell auf 0° C abgekühlt. Zur Neutralisation wurde so viel Triäthanolamin-HCL-Phosphat-Lösung (2) zugegeben, bis ein pH von 7,8 erreicht war. Um eine Flockung des denaturierten Proteins zu erreichen, wurden die Extrakte 5 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das ausgefällte Eiweiß 5 min bei Zimmertemperatur - im vorgekühlten Zentrifugeneinsatz - abzentrifugiert. Der weitgehend klare Überstand wurde sofort zum Test verwendet.

2. Zusammensetzung der Lösungen

(1) Alkoholische Kalilauge (0,5 N)

2,8 g KOH mit einer Mischung gleicher Volumenanteile Äthanol und aqua dest. ad 100 ml lösen.

(2) Triäthanolamin-HCL-Phosphat-Lösung

9,3 g Triäthanolamin-hydrochlorid (0,5 M) wurde mit einer Mischung aus 5,44 g KH_2PO_4 (0,4 M) und 1,74 g K_2HPO_4 (0,1 M) mit aqua dest. ad 100 ml gelöst.

3. Testvorschriften

Reaktion



Reagentien

- | | | |
|----------------|------------|----------|
| 1. TRAP | 100 mM | pH = 7,6 |
| EDTA | 1 mM | |
| 2. GSSG-Lösung | 1 mM | |
| 3. GR-Lösung | unverdünnt | |

Testzusammensetzung

1,0 ml Extrakt	0,5 ml Extrakt
	0,5 ml TRAP/EDTA
0,05 ml GSSG	0,05 ml GSSG

Start mit 0,005 GR

Start mit 0,005 GR

Wellenlänge 340 nm

Temperatur 25° C

Normalcuvette d = 1

Messung gegen Luft

c) Bestimmung von G-6-P, 6-PG und NADP

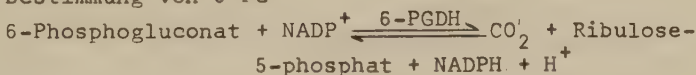
1. Herstellung des Extraktes

Zur Bestimmung von G-6-P, 6-PG und NADP wurde ein Extrakt aus drei Hornhautepithelien hergestellt. Als Extraktionsmedium wurde 2 ml 0,5 N Perchlorsäure verwandt. Die Homogenisierung erfolgte ebenfalls unter laufender Kühlung in einem Glas-in-Glas-Homogenisator 10 min lang. Anschließend wurde das Homogenat bei 4000 U/min zentrifugiert. Der hierdurch erhaltene Überstand wurde aufbewahrt, das Sediment mit 0,5 ml 0,5 N Perchlorsäure versetzt und nochmals im Glas-in-Glas-Homogenisator 5 min homogenisiert, wieder zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden nun vereinigt und mit 10 N NaOH auf pH 7,0 gebracht. Das ausgefallene Perchlorat wurde in der gekühlten Ultrazentrifuge "Omikron" 10 min lang bei 20.000 U/min abzentrifugiert. Das Zentrifugat stellte den Extrakt dar, der sofort für die Metabolitbestimmungen verwandt wurde.

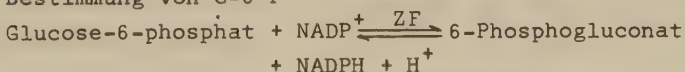
2. Testvorschriften

Reaktionen

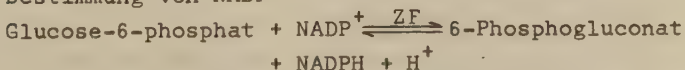
(I) Bestimmung von 6-PG



(II) Bestimmung von G-6-P



(III) Bestimmung von NADP



Reagentien

- 1 TRAP 100 mM
EDTA 1 mM pH = 7,6
2. Mg Cl-Lösung m/10 (1/10 Mol. Gew. in 1 ml)
3. NADP-Lösung 25 mM (20 mg/ml)
4. G-6-P-Lösung 100 mM (31 mg/ml)
5. 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Lösung unverdünnt
6. Zwischenferment-Lösung 1:20
(Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase)

Testzusammensetzung

- (I) 1,0 ml TRAP/EDTA
 1,0 ml Extrakt
 0,05 ml NADP
 0,02 ml Mg Cl
-

Start mit 0,005 6-PGDH

- (II) 0,5 ml TRAP/EDTA
 0,5 ml Extrakt
 0,02 ml NADP
-

Start mit 0,005 ml ZF

- (III) 0,5 ml TRAP/EDTA
 0,5 ml Extrakt
 0,02 ml G-6-P
-

Start mit 0,005 ml ZF

Wellenlänge 334 nm

Temperatur 25° C

Halbmikrocuvette d = 2 benutzt bei (II) und (III)

Halbmikrocuvette d = 5 benutzt bei (I)

Schreibskala 0 - 0,25

"Start" bedeutet bei allen beschriebenen Reaktionen: Nach Prüfen eines Rühreffektes bzw. der vorhergehenden Reaktionen wurden die kleinen Flüssigkeitsmengen mit Mikropipetten auf einen feinen Kunststoffstab ("Plümper") aufgebracht und ohne Verlust in die Cuvette eingebracht.

d) Bestimmung von ASC, DHA und H_2O_2

1. Herstellung des Extraktes

Die Extraktion wurde in ähnlicher Weise, wie unter a) 1. beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde das feste Untersuchungsmaterial (Epithel und Stroma) mittels eines Glas-in-Glas-Homogenisators, der 2 ml Oxalsäure und 1 ml 0,5 N Perchlorsäure enthielt, 10 min unter Eiskühlung homogenisiert. Der Homogenisierung des Stromas wurde eine grobe Zerkleinerung unter flüssigem Stickstoff vorgeschaltet. Die Oxalsäure dient zur Stabilisierung der zu messenden ASC, die Perchlorsäure zur Eiweißfällung. Flüssiges Untersuchungsmaterial (Kammerwasser) wurde in Zentrifugenröhrchen eingebracht und die darin enthaltene ASC mittels 1 ml Oxalsäure stabilisiert. Die Eiweißfällung erzielten wir durch 10-minütiges Einwirken von 1 ml 0,5 N Perchlorsäure bei Zimmertemperatur. Danach wurde das ausgefällte Eiweiß durch 5 min Zentrifugieren bei 4000 U/min beseitigt.

Wie unter 3. beschrieben, verwendeten wir zwei verschiedene Bestimmungsmethoden.

2. Photometrische ASC-Bestimmung mit
2,4-Dinitrophenylhydrazin

In einem 50 ml Scheidetrichter wurde der Extrakt mit 5 ml 2,6-Dichlorphenolindophenol versetzt. Nach etwa 2 min wurde der Überschuß an 2,6-Dichlorphenolindophenol mit ca. 50 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die wässrige

Phase wurde in gleiche Mengen geteilt und in zwei mit Millilitereinteilung versehene Reagenzgläser eingebracht. Die Ätherphase wuschen wir mehrfach mit kleinen Anteilen Oxalsäure. Mit den Waschflüssigkeiten füllten wir die Reagenzgläser bis zur 6 ml Marke auf und versetzten sie jeweils mit 2 Tropfen Thioharnstofflösung.

Die eine der beiden Lösungen (Hauptversuch, P) wurde mit 1 ml DNPH-Lösung versetzt, umgeschüttelt und zur Bildung des Osazons drei Stunden in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Danach kühlen wir ab und versetzen sie im Eisbad langsam unter Umschwenken tropfenweise mit 6 ml 85%iger Schwefelsäure zur 10 ml Marke.

Die andere Lösung (Blindversuch, B) wurde ebenfalls in Eisbad gekühlt und mit 1 ml DNPH-Lösung sowie 6 ml 85%iger Schwefelsäure versetzt.

In genau gleicher Weise wurde eine Vergleichslösung mit dem in der Probelösung etwa erwarteten Gehalt an ASC mit 2,6-Dichlorphenolindophenol oxidiert und der Kondensation mit DNPH-Lösung unterworfen. Der Blindversuch für die Vergleichslösung wurde wie der Probelindversuch durch Zugabe der DNPH-Lösung erst kurz vor der 85%igen Schwefelsäure hergestellt.

Wenn der Gehalt an DNA bestimmt werden soll, unterbleibt die vorherige Oxidation mit 2,6-Dichlorphenolindophenol. Nach 30 min haben wir die Extinktion im Photometer Beckman DU-2A bei 578 nm mit Normalcuvetten, $d = 1\text{ cm}$, Halbmikrocuvetten, $d = 2$, je nach ASC-Konzentration gemessen.

3. Zusammensetzung der Lösungen

(1) Oxalsäure-Lösung:

10 g Oxalsäure werden mit aqua dest.
ad 1 Liter gelöst.

(2) Thioharnstoff-Lösung:

10 g Thioharnstoff werden in 100 ml einer
Mischung gleicher Raumteile Äthanol absolut
und aqua dest. gelöst.

(3) 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung:

0,25 g Dichlorphenolindophenol-Natrium
werden mit aqua dest. ad 100 ml gelöst.

(4) DNPH-Lösung:

2 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin werden in
100 ml einer noch warmen Mischung aus
3 Raumteilen Wasser und 1 Raumteil Schwefel-
säure 95-97 % (1,84) gelöst.

(5) Ascorbinsäure-Lösung:

50 mg L (+) Ascorbinsäure werden im
500-ml-Meßkolben in etwa 100 ml Oxalsäure-
Lösung gelöst. Die Lösung wird mit dem
gleichen Lösungsmittel zur Marke ergänzt.
Ein aliquoter Teil davon wird mit Oxalsäure-
Lösung auf die im Standardversuch benötigte
Konzentration verdünnt.

(6) Schwefelsäure:

85%ig: 85 g Schwefelsäure 95-97 % (1,84)
werden vorsichtig unter Eiskühlung und Um-
rühren in 15 ml aqua dest. einlaufen ge-
lassen.

(7) Perchlorsäure:

0,5 N: 5,2 ml 70%ige Perchlorsäure wird
mit aqua dest. ad 100 ml verdünnt.

4. Photometrische ASC-Bestimmung mit 2,6-Dichlorphenolindophenol

Ein bekanntes Volumen (0,02 ml) einer 2,6-Dichlorphenolindophenolstandardlösung wurde in eine Normalcuvette $d = 1$ pipettiert und mit 1 ml K-Na-Phosphatpuffer, pH 6,6, verdünnt. Nach gründlichem Rühren bestimmten wir die Extinktion bei 600 nm. Danach wurde eine Probe des Extraktes (0,005 - 0,3 ml) dazugegeben, nochmals gut umgerührt und nach ca. 3 min die Extinktion abgelesen.

Die Extinktionsdifferenz ist direkt proportional zu der vorhandenen Menge ASC.

Der von uns für diese Bestimmung verwandte Extrakt war nicht - wie unter d.1. beschrieben - enteiweißt, sondern das Gewebe wurde mittels 2 ml K-Na-Phosphatpuffer gepottert und anschließend unter Kühlung zentrifugiert. Der verhältnismäßig klare Überstand wurde sofort zum Test verwendet.

5. Berechnung der Einzelwerte

Unsere Metabolitbestimmungen wurden mittels enzymatisch-optischer und colorimetrischer Verfahren durchgeführt, dadurch ergeben sich für die einzelnen Bestimmungsmethoden spezielle Formeln zur Berechnung der Metabolitgehalte.

a) Berechnung von GSH, GSSG, G-6-P, 6-PG, NADPH und NADP

$$\frac{E \times \text{Testvolumen} \times \text{Extraktvolumen}}{\epsilon \times d \times \text{Spreizung} \times \text{Einsatzvolumen} \times \text{Gewebsgewicht}} = \frac{\text{Mol}}{\text{g (frisch)}}$$

E = Extinktionsdifferenz

ϵ = Extinktionskoeffizient

für 334 m μ = $6,09 \times 10^6$

für 366 m μ = $3,3 \times 10^6$

für 340 m μ = $6,28 \times 10^6$

für 240 m μ = $3,37 \times 10^6$

d = Schichtdicke der Cuvette

b) Berechnung von ASC_{ges} und DHA

$$\frac{E_p - E_{pbl}}{E_v - E_{vbl}} \times V \text{ (}\mu\text{g)} \times \frac{\text{Extraktvolumen}}{\text{Gewebsgewicht}} = \frac{\mu\text{g Gesamt-Vitamin-C}}{\text{g (frisch)}}$$

- E_p = Extinktion der Hauptversuchslösung
 E_v = Extinktion der Vergleichslösung
 E_{pbl} = Extinktion der Blindlösung des Hauptversuchs
 E_{vbl} = Extinktion der Blindlösung des Vergleichsversuchs
 $V(\mu\text{g})$ = Volumen der Vergleichslösung, die x μg ASC enthält

c) Berechnung von ASC

$$\frac{E \times \text{Testvolumen} \times \text{Extraktvolumen}}{\text{Einsatzvolumen} \times \text{Gewegsgew.}} = \frac{\mu\text{g Ascorbinsäure}}{\text{g (frisch)}}$$

- E = Extinktionsdifferenz

6. Die statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Metabolitbestimmungen wurden größtenteils als Doppelbestimmungen mit verschiedenen hohen Einsätzen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde als Einzelwert betrachtet und statistisch ausgewertet. Die Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und der Abweichung des Mittelwertes erfolgte nach den hier wiedergegebenen Formeln:

1. Summe der Einzelwerte $\Sigma x = \Sigma s(x)$
2. Summe der Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert $\Sigma (x-M)$
3. Summe der Abweichungen im Quadrat $\Sigma (x-M)^2$

Wenn die Zahl der Einzelwerte x ist, dann ist der Mittelwert $M = s_{(x)} : n$

Die Streuung ist $s^2 = \frac{s_{(x)}^2 - M \cdot s_{(x)}}{n - 1}$

Die Standardabweichung errechnet sich aus der Quadratwurzel der Streuung s^2

$$s = \sqrt{\frac{s_{(x)}^2 - M \cdot s_{(x)}}{n - 1}}$$

Die Streuung des Mittelwertes der Stichproben wird bestimmt nach:

$$s_M^2 = \frac{1}{n} s^2$$

und die Standardabweichung der Mittelwerte nach:

$$s_M = \frac{1}{\sqrt{n}} \cdot s$$

IV. ERGEBNISSE UND BESPRECHUNG

1. Bestimmung von Metaboliten im Epithel, Stroma und Endothel der Cornea sowie des Kammerwassers von Rinderaugen

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 1., 2., 3. und 4. zusammengestellt. Es sind die Metabolitgehalte als Mittelwerte (m) mit Standardabweichung (Sm) und die Anzahl der Einzelmessungen (n) aufgeführt. Die entsprechenden Einzelmessungen werden in den Tabellen des methodischen Anhangs dargestellt.

Metabolit	m	s _m	n
GSH	3637	± 246	20
GSSG	1149	± 50	20
NADPH	612	± 38	15
NADP	126	± 7,23	14
G-6-P	719	± 64	15
6-PG	49	± 519	15
ASC _{ges.} 1)	5188	± 677	15
DHA 2)	539	± 35	10
ASC 3)	5764	± 524	10
ASC _{ges.} - DHA	4649		10

1) u. 2) Bestimmung mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin

3) " " mit 2,6 Dichlorphenolindophenol

Tab. 1:

Metabolitkonzentrationen im Epithel der Rindercornea in n Mol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Metabolit	m	s _m	n
GSH	Ø	± 0	15
GSSG	28	± 2,16	15
ASC _{ges} 1)	298	± 29	10
DHA 2)	172	± 23	10
ASC _{ges} -DHA	126		10

1)u.2)Bestimmung mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin

Tab. 2:

Metabolitkonzentrationen im Stroma der Rindercornea
in n Mol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Metabolit	m	s _m	n
GSH	Ø	± 0	10
GSSG	Ø	± 0	10

Tab. 3:

Metabolitkonzentrationen im Endothel der Rindercornea
in n Mol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Metabolit	m	s _m	n
ASC ges. 1)	906	± 33	15
DHA 2)	69	± 4,78	10
ASC 3)	713	± 41	10
ASC _{ges.} - DHA	837		10

- 1) u. 2) Bestimmung mit 2,4 Dinitrophenylhydrazin
 3) - " - mit 2,6 Dichlorphenolindophenol

Tab. 4:

Metabolitkonzentrationen im Kammerwasser des Rinderauges in n Mol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

2. Vergleich unserer Ergebnisse mit Angaben aus der Literatur

In den Tabellen 5, 6 und 7 sind die Ergebnisse der Metabolitbestimmungen der einzelnen Kompartimente des Rinderauges neben den Ergebnissen anderer Autoren eingetragen. Tabelle 5 zeigt, daß unsere Glutathionbestimmungen einen höheren GSSG-Gehalt aufweisen als die von BEERMANN, obwohl die Summe der GSH- und GSSG-Werte etwa gleich groß ist. Auch das G-6-P zeigt auffallende Differenzen zwischen unseren Werten und denen, die BEERMANN ermittelte, nachdem er das Corneaepithel in situ eingefroren hat (Frierstopmethode). Es liegt ziemlich niedrig bei Verwendung der Frierstopmethode und etwa 6 mal höher, wenn - wie bei unserer Methode - das Epithel erst abradiert und dann eingefroren wurde.

Vergleichswerte aus der Literatur

	eigene Werte warme Abrasio pH 7.0	BEERMANN Frierstop pH 3.5	BEERMANN warme Abrasio pH 3.5	PIRIE	ANDERSON u SPECTOR	HERRMANN u MOSES	HERRMANN u MOSES
GSH	3637 ± 246 n = 20	2780 ± 132 n = 21	5614 ± 868 n = 21		3930 ± 120 n = 2	4995 ± 286 n = 4	3811 ± 245 n = 10
GSSG	1149 ± 50 n = 20	373 ± 14.9 n = 20	183 ± 14.9 n = 16			Ø	
GSH/GSSG	3.4 ± 0.34 n = 20	10 ± 108 n = 19	30.7 ± 708 n = 16				
NADPH	612 ± 38 n = 15	235 ± 21 n = 15					
NADP	126 ± 723 n = 14	165 ± 10 n = 22					
G-6-P	719 ± 64 n = 15	109 ± 73 n = 6	619 ± 154 n = 5				
A S C	5764 ± 524 n = 10			4116 ± 656 n = 4	3815 ± 539 n = 2		

* direkte Methode, (bei indirekter Methode 196 ± 17.1, n = 8)

Tab. 51

Metabolitgehalte des Hornhautepithels von Rinderaugen

Metabolit	eigene Werte	Vergleichswerte aus der Literatur	
		PIRIE	HERRMANN MOSES
GSH	$\emptyset$ n = 15	$141 \pm 28,7$ n = 6	$174 \pm 28,7$ n = 3
GSSG	$28 \pm 2,16$ n = 15	$\emptyset$	$\emptyset$
ASC _{ges.}	298 ± 29 n = 10		
DHA	172 ± 23 n = 10		
ASC _{ges.} - DHA	126 n = 10	$951 \pm 14,2$ n = 4	

Tab. 6:

Metabolitgehalte des Hornhautstromas von Rinderaugen

Metabolit	eigene Werte	Vergleichswerte aus der Literatur
		PIRIE
ASC _{ges.}	906 ± 33 n = 15	
DHA	$69 \pm 4,78$ n = 10	
ASC _{ges.} - DHA	837 n = 10	1476 ± 242 n = 4
ASC	713 ± 41 n = 10	1476 ± 242 n = 4
* gleiche Werte, da $ASC = ASC_{ges} - DHA$		

Tab. 7:

Metabolitgehalte des Kammerwassers von Rinderaugen

Sein Vergleich von HERRMANNs G-6-P-Werten, die mit der gleichen Präparationsmethode ermittelt wurden, zeichnen sich unsere Werte durch ihre geringere Standardabweichung aus. Das gleiche kann für die NADPH-Werte festgestellt werden, wobei das NADP bei beiden Präparationsmethoden in der gleichen Größenordnung lag.

Der 6-PG-Gehalt scheint vom G-6-P-Gehalt im Verhältnis 1:15 bis 1:20 abzuhängen.

Die Werte für Gesamtascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure, die mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin bestimmt wurden, sind nur in Tab. 1 wiedergegeben, da Vergleichsliteratur nicht vorhanden ist. Die Werte liegen im selben Bereich wie die für GSH und GSSG.

Die ASC-Werte liegen, bei Verwendung fast gleicher Präparations- und Bestimmungsmethoden, etwa in der gleichen Größenordnung wie die von PIRIE sowie ANDERSON und SPECTOR.

Im Corneaeendothel konnte mit der angewandten Präparations- und Analysenmethode weder GSH noch GSSG nachgewiesen werden (Tab. 3).

Im Corneastrova wurde nur GSSG gefunden (Tab. 6), GSH konnte nicht entdeckt werden. HERRMANN und MOSES fanden im Unterschied dazu das Glutathion nur in seinem reduzierten Status.

Die ASC-Werte wurden, da nur mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin bestimmt, aus den Werten der Gesamtascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure ($ASC_{ges.} - DHA = ASC$) errechnet. Sie sind etwa genau so groß wie die DHA-Werte und etwa 7 mal kleiner als die hierfür herangezogenen ASC-Werte von PIRIE.

Auch das Kammerwasser enthielt $ASC_{ges.}$ und DHA (Tab. 7), wenn auch in geringerer Konzentration als das Corneae-epithel. Bei Anwendung fast gleicher Methoden erhielten wir jedoch nur etwa halb so viel ASC wie PIRIE angegeben hat.

V. DISKUSSION

1. Methodische Betrachtungen

a) Corneaepithel

1) GSH / GSSG

Die Bestimmung des reduzierten und des oxydierten Glutathion erfolgte im Perchlorsäureextrakt. Die Messung der beiden Metaboliten wurde im optischen Test mit Hilfe der Glyoxalase I und der Glutathionreduktase vorgenommen. Im Gegensatz zu den kolorimetrischen Verfahren mit Hilfe einer Farbreaktion auf SH-Gruppen sind die enzymatischen Bestimmungen spezifisch, obwohl auch die Glutathionreduktase mit gemischten Disulfiden reagiert (BEUTLER, Glutathionsymposium, Tübingen, 1973). Im Perchlorsäureextrakt dürften jedoch höher molekulare Peptiddisulfide, die an einer Seite Glutathion, an der anderen Seite ein anderes Peptid enthalten, relativ wenig vorkommen. Die Bestimmung der reduzierten und der oxydierten Stufe des Glutathion in einem kombinierten optischen Test hat den Vorteil, daß die Relation GSH zu GSSG mit relativ hoher Genauigkeit bestimmt werden kann.

Ein Problem bereitet wie bei allen Glutathionbestimmungen die spontane Oxydation des GSH zum GSSG in Gegenwart von Sauerstoff. Insbesondere wird dem Perchlorat nachgesagt, daß es als Oxydationsmittel GSH zu GSSG in ganz beträchtlichem Maß umsetzt. In unserem Laboratorium wurde diese Frage überprüft (ASSHAUER, 1973, persönl. Mitteilung). Es zeigte sich, daß nur bei längeren Inkubationszeiten eines Gewebsextraktes mit 0,5 normaler Perchlorsäure meßbare Mengen an Glutathion oxydiert werden. Bei den vorliegenden Experimenten dauerte die Perchlorsäureextraktion höchstens 10 min, alle Arbeitsvorgänge wurden im Eisbad vorgenommen. Die Bestimmung der Glutathionspiegel erfolgte unmittelbar nach der Extraktion. Aus diesem Grunde dürfte die spontane Bildung von GSSG aus GSH unter unseren Extraktionsbedingungen zu vernachlässigen sein.

Eine weitere spontane Umsetzung des GSH zum GSSG erfolgt bei neutralen oder alkalischen pH-Werten entsprechend der Dissoziationskonstante des GSSG. Dementsprechend zeigte sich bei einer Meßserie von 20 Glutathionbestimmungen ein erstaunlich hoher GSSG-Gehalt, wenn die Wasserstoffionenkonzentration bei pH 7,0 lag. Bei gleicher Extraktion und einer Neutralisation des Perchlorsäureextraktes auf nur pH 3,5 lag der GSSG-Spiegel wesentlich niedriger, die Summe der GSH- und GSSG-Werte war jedoch gleich hoch wie bei dem Extrakt, der auf pH 7,0 neutralisiert worden war (BEERMANN, 1972, persönl. Mitteilung). Bei unserer Betrachtung der Relationen der Metabolit Spiegel müssen wir für das Glutathion die Ergebnisse der Extrakte mit einem pH von weniger als 4 verwenden.

Die Glutathionspiegel, die wir im Corneaepithel ermittelt haben, liegen etwa in der gleichen Höhe wie diejenigen, die PIRIE und v. HEYNINGEN sowie HERRMANN und MOSES und ANDERSON u. SPECTOR früher veröffentlicht haben. Letztere geben leider keine Informationen über die Relation von GSH zu GSSG.

Einen Überblick aus der Literatur über die GSH- und GSSG-Konzentrationen in den einzelnen Kompartimenten des Auges sowie den verschiedensten Geweben des Gesamtorganismus zeigen Tab. 8 und 9.

Gewebe		Colorimetr.		Glyoxal.
		GSH	GSSG	GSH
Linse	gesamt	10107		7742
	Cortex	15708	490	
	Kern	2480	918	
	gesamt (embryonal)	10413		
	gesamt (Kaninchen)	11389		
	Kern (Kaninchen)	3905	1208	
Cornea	gesamt	748		879
Epithel		8310	0	4995
Stroma		141	0	173
Epithel (embryonal)		163		
Retina		2395	0	2473
(embryonal)		1952		
Ciliarkörper		872	266	853
Iris		869	294	573

Tab. 8:

GSH- und GSSG-Spiegel in den verschiedenen Geweben
des RinderAuges.
Dimension in n Mol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)
(modifiziert nach HERRMANN u. MOSES).

Methoden	Kaninchen		Ratten							
	colorimet.	glyoxal.	colorimetr.		glyoxal.	colorimetr.				
			0.3H	0.55G		0.3H	0.3H			
Niere	2799	4035			3254	5393	93	3299	4361	1999
Leber	2347	3234			4556			2525		2195
Herz	2447	2635	2543	726	1952	2115	1699	664	2740	2195
Blase	2353				4250	4063			3254	2443
Magen	1774	2633	1753	713						
Speich.	325		157	679						
Gesamt					512		6573	762	5727	5835

Tab. 9)

0.3H und 0.55G sind die einzigen Zahlen, die in der Tabelle angegeben sind. (10. 10. 10.)

2) Ascorbinsäure / Dehydroascorbinsäure

Wie schon beschrieben, wandten wir für unsere Ascorbinsäurebestimmungen zwei verschiedene spektrometrische Methoden an. Die Ergebnisse zeigen, daß bei alleiniger Bestimmung der Ascorbinsäure die einfachere und schnellere Methode mit 2,6-Dichlorphenolindophenol durchaus ausreichend ist. Der Vergleich unseres Wertes von 5764 n Mol/g mit den Werten von PIRIE 4116 n Mol/g sowie ANDERSON u. SPECTOR 3815 n Mol/g ergibt - bei Verwendung fast gleicher Methoden - nur geringe Unterschiede.

RINDER CORNEA [µ Mol/g Frischgewicht]			
ASC	4.7	0.13	0.84
DHA	0.5	0.17	0.07
GSH	2.8	0	-
GSSG	0.4	0.03	-

Abb. 3:

Die Verhältnisse der Redoxstufen von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure und reduziertem Glutathion zu oxydiertem Glutathion in den einzelnen Kompartimenten des Rinderauges.

Demgegenüber besitzt die Methode mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin den Vorteil, daß sie auf verhältnismäßig einfache Weise die Erfassung der Gesamtascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure gestattet. Leider wird bei dieser Methode die 2,3-Diketo-L-gulonsäure, ein nicht ascorbinsäurewirksames Oxydationsprodukt der Dehydroascorbinsäure, miterfaßt. Da der Gehalt schnell verarbeiteter Rinderepithelien an 2,3-Diketo-L-gulonsäure im Vergleich zum Gesamtascorbinsäure- und Dehydroascorbinsäuregehalt in der Regel sehr gering sein müßte, verzichteten wir auf deren Bestimmung.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Ascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure im Corneaepithel zeigte zwischen diesen beiden Metaboliten ein ähnliches Verhältnis der Redoxstufen wie beim Glutathion (Abb. 3). Die Ascorbinsäure, der reduzierte Metabolit lag bei

4649 n Mol/g, die oxydierte Stufe dieses Moleküls wies nur einen Gewebsgehalt von 539 n Mol/g auf. Die Relation zwischen reduzierter und oxydierter Stufe war etwa die gleiche wie beim Glutathion. Der Anteil der Dehydroascorbinsäure am Gesamtascorbinsäuregehalt (d.h. von Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure zusammen) beträgt im Corneaepithel 10,4 %. Das entspricht der Größenordnung, die LLOYD u. SINCLAIR (1953) für das Vollblut und den Muskel (9 - 14 %) von Meerschweinchen angegeben haben. Der Anteil an Dehydroascorbinsäure beträgt beim Meerschweinchen in der Niere, Nebenniere, Leber, Milz, Pankreas und Gehirn durchschnittlich 0 - 3 % (LLOYD u. SINCLAIR, 1953).

Nach STEWART et al. beträgt beim Menschen der Gehalt an Dehydroascorbinsäure im Plasma 20 - 30 % vom Gesamtascorbinsäuregehalt.

Die Größen der durch die zwei von uns benutzten Verfahren ermittelten ASC-Spiegel zeigen derart geringe Unterschiede, daß sie denen in vivo wahrscheinlich nahekommen werden. Der Vergleich des Konzentrationsverhältnisses

nisses von Dehydroascorbinsäure zur Gesamtascorbinsäure (10,4 %) mit den Angaben aus der Literatur läßt den Schluß zu, daß der von uns ermittelte Dehydroascorbinsäuregehalt von 539 n Mol/g ebenfalls in physiologischen Bereichen liegt.

Zur Zeit müssen die vorliegenden Ascorbinsäurewerte in dieser Form akzeptiert werden, da vergleichende Untersuchungen mit grundsätzlich anderen Extraktionsverfahren bzw. Bestimmungsmethoden nicht vorliegen.

3) NADP / NADPH

Die Bestimmung der Pyridinnucleotide erfolgte mit den bewährten enzymatisch-optischen Methoden für NADP mit Perchlorsäureextrakt und für NADPH im alkalischen Extrakt. Die Spiegel von NADP und NADPH liegen in einer Größenordnung, die schon in der klassischen Arbeit von GLOCK und McLEAN für die Leberzelle gefunden wurde. Ähnliche Werte lassen sich auch aus den Daten von KLINGENBERG, SLENSKA u. RITT entnehmen.

Im Corneaepithel wurde in den hier vorliegenden Versuchen eine wesentlich höhere Konzentration von NADPH und NADP gefunden. Die Relation zwischen NADP und NADPH betrug im Durchschnitt 0,206. Im Gegensatz dazu fand BEERMANN (1973) bei Präparation des Corneaepithels im Frierstopverfahren einen NADP/NADPH-Quotienten von 0,702.

4) G-6-P und 6-PG

Diese beiden Metabolite des Hexosephosphat-Shunt dürften in methodisch zuverlässigen Extraktions- und Bestimmungsverfahren ermittelt worden sein (HOHORST, KREUTZ u. BÜCHER, 1959; REIM, MEYER u. CATTEPOEL, 1968). Auffällig ist der relativ hohe Gehalt an G-6-P, der nach Präparation im Frierstopverfahren wesentlich niedriger ausfiel.

b) Corneastroma

Die Bestimmung des Glutathion und der Ascorbinsäure im Corneastroma führte zu problematischen Ergebnissen, weil die Extraktion dieses festen Gewebes mit so geringem Zellgehalt Schwierigkeiten bereitete. Wir fanden nur 18 n Mol/g Stroma GSSG und kein GSH im Gegensatz zu HERRMANN u. MOSES, die GSH in einer Größenordnung fanden, die unserem GSSG-Wert entspricht. Bei der Ascorbinsäure lagen die Spiegel auch wesentlich niedriger als im Corneae-
pithel, jedoch konnte Ascorbinsäure im Stroma sicher nachgewiesen werden. Allerdings lagen die Werte insgesamt niedriger als diejenigen, die PIRIE angegeben hat. Jedoch müssen unsere Ascorbinsäurewerte mit einer gewissen Zurückhaltung betrachtet werden, da die Hornhautstromata vor der Ascorbinsäurebestimmung bei ca. -20°C gelagert wurden. Das kann einen gewissen Ascorbinsäurezerfall bzw. -verlust durchaus bedingt haben.

Im Endothel konnten weder GSH noch GSSG nachgewiesen werden, obwohl bei der Addition zahlreicher Rinderendothelien solche Metabolite nachweisbar sein müssen, wenn sie in nennenswerten Mengen vorkommen.

c) Kammerwasser

Im Kammerwasser fanden wir 713 n Mol/g Ascorbinsäure und weniger als 1/10 Dehydroascorbinsäure. PIRIE hat etwa gleichviel Ascorbinsäure mitgeteilt. Die Betrachtung der Spiegel der genannten Metabolite in den drei Schichten der Cornea führt zu dem Ergebnis, daß Ascorbinsäure im Kammerwasser und im Corneastroma vorkommen und in erheblich höheren Maße im Corneae-
pithel gefunden wurde. Hier handelt es sich offenbar um eine Substanz, die sowohl extra- als auch intrazellulär vorkommt und möglicherweise die Funktion eines Transportmetaboliten für reduzierende Reaktionen darstellt.

Das Glutathion kommt sehr wahrscheinlich nur intrazellulär vor, denn es wurde in hohen Mengen im Epithel gefunden,

in geringen Mengen im Stroma und im Kammerwasser überhaupt nicht. Es ist noch unklar, warum Glutathion im Endothel nicht nachgewiesen werden konnte. Vielleicht sind hier doch die Schwierigkeiten bei der Präparation die Ursache für das negative Ergebnis.

	<u>Hornhaut- stroma</u>	<u>Kammerwasser</u>
GSH	- (10)	-
GSSG	28 $\pm$ 2 (10)	-
ASC	126 $\pm$ 12 (10)	837 $\pm$ 30 (15)
DHA	172 $\pm$ 23 (10)	69 $\pm$ 5 (10)

Tab. 10:

Vergleich der Glutathion- und Ascorbinsäurekonzentrationen im Hornhautstroma und Kammerwasser von Rinderaugen.

Dimension in n Mol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

2. Das Glutathion- / Hexosephosphat-System

In dieser Arbeit wurden unter vergleichbaren Bedingungen die Metabolite des Hexosephosphat-Shunt, des Glutathion, die Ascorbinsäure und die Triphosphopyridinnucleotide bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Ziel nachzuweisen, daß die Metabolite dieser Reaktionen im Corneae epithel überhaupt vorkommen. In früheren Arbeiten, insbesondere von HENNIGHAUSEN, wurde gezeigt, daß die Enzyme, die die Reaktionen des Hexosephosphat-Shunt und des Glutathion katalysieren, im Corneae epithel in ausreichenden Aktivitäten vorkommen. HENNIGHAUSEN hat nachgewiesen, daß Hexokinase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in fast gleich hohen Aktivitäten im Corneae epithel zu finden sind. HEUVELS^{†)} zeigte, daß auch die

^{†)} Persönl. Mitteilung

Glutathionperoxydase, welche die Oxydation des Glutathion mit Hilfe von H_2O_2 katalysieren, im Corneaepithel in etwa gleich hoher Aktivität vorkommt wie die vorher genannten Enzyme. Die Aktivitäten reichen aus, um erhebliche Mengen dieser Substanzen umzusetzen.

Es ist also zu vermuten, daß das Reaktionssystem des Hexosephosphat-Shunt mit demjenigen des Glutathion durch die Triphosphorpyridinnucleotide verknüpft ist.

Eine Möglichkeit, an Hand der Metabolitspiegel zu prüfen, ob in vivo tatsächlich Stoffwechselreaktionen dieser Art stattfinden, bietet die Berechnung der scheinbaren Gleichgewichtskonstanten nach dem Massenwirkungsgesetz nach der Art, wie es HOHORST für Leber und Muskel 1959 ausgeführt hat. Die Berechnung des Massenwirkungsgleichgewichtes aus den im Corneaepithel gefundenen Metabolitspiegeln für die Reaktionspartner der Glutathion-Reduktase gibt einen Wert von $3,57 \times 10^5$. Dieses Ergebnis spricht für den bekannten Reaktionsmechanismus der Glutathionreduktase, der eine fast vollständige Umsetzung des GSSG zu GSH katalysiert, wenn ausreichend NADPH vorhanden ist. Neue in vitro-Bestimmungen des Glutathionreduktasegleichgewichtes durch CATTEPOEL (1973, persönl. Mitteilung) führten zu ähnlichen Ergebnissen. Der Berechnung des Reaktionsgleichgewichtes der Partner der Glutathionperoxydase steht die Tatsache entgegen, daß die Konzentration des H_2O_2 und der Peroxyde überhaupt im Corneaepithel unbekannt ist, wobei wir die Werte von ANDERSON u. SPECTOR nur mit großer Zurückhaltung bewerten. Dagegen ist es möglich, die Gleichgewichtskonstante der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu errechnen. Sie liegt nach den Metabolitspiegeln dieser Arbeit bei $3,3 \times 10^{-5}$, und damit in der gleichen Größenordnung wie eine Angabe der Zusammenstellung von RAUEN der Gleichgewichtskonstanten, der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase von 6×10^{-5} , unter in vivo-Bedingungen.

Frierstopmethode

warmer Abrasio

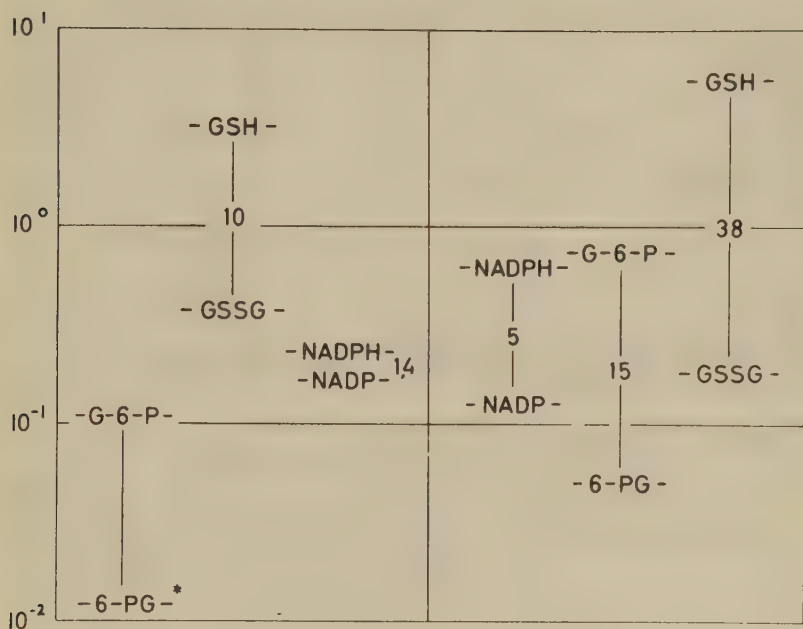


Abb. 4: Verteilungsmuster einiger in der Rindercornea vorkommender Metabolite bei Verwendung unterschiedlicher Präparationsmethoden.
(Dimension in μ Mol/g Frischgewicht)

Die Berechnung des Massenwirkungsgleichgewichtes für die G-6-PDH aus den Werten von BEERMANN gibt einen Wert von $2,62 \times 10^{-6}$, wobei der 6-PG-Wert mit $1/15$ des G-6-P. also 20 n Mol/g angenommen wurde. Analysen lagen nicht vor.

	G-6-P- Dehydrogenase		Glutathion- reduktase	
	Ks	Eo	Ks	Eo
frische Abrasio	$3,31 \times 10^{-5}$		$3,57 \times 10^5$	
Frierstop- methode	$2,62 \times 10^{-6}$		$1,47 \times 10^5$	
theoretische Konstanten ^{*)}	6×10^{-5}			

Tab. 10:

Scheinbare Gleichgewichtskonstanten und Redox-
potentiale im Epithel der Rindercornea bei bestimm-
ten Präparationsmethoden.

^{*)} RAUEN, Biochemisches Taschenbuch, 3. edition,
Vol. 2, Pg. 698 ff., Springer Verlag,
Berlin, Heidelberg, 1964

Frierstopmethode¹⁾

warme Abrasio

GSH	3220	± 132	(21)	5614 ¹⁾	± 868	(21)
GSSG	373	± 30	(20)	183 ¹⁾	± 15	(16)
GSH/GSSG	10	± 1,08	(19)	37,6 ¹⁾	± 7,1	(16)
NADPH	235	± 21	(15)	612	± 38	(15)
NADP	165	± 10	(22)	126	± 7	(14)
G-6-P	109	± 7	(5)	719	± 64	(15)
6-PG	- - - - -	- - - - -	- - - - -	49	± 5	(15)
ASC	- - - - -	- - - - -	- - - - -	4649	± 642	(15)
DHA	- - - - -	- - - - -	- - - - -	539	± 35	(10)
ATP	2590	± 95	(11)	1012 ¹⁾	± 166	(5)
ADP	308	± 9	(11)	1974 ¹⁾	± 218	(5)
ATP/ADP	10,5	± 0,5	(11)	0,53 ¹⁾	± 0,11	(5)

Tab. 11:

Vergleich des Metabolitspiegels im Epithel der Rinder-cornea bei Verwendung verschiedener Präparationsmethoden (Frierstopmethode und warme Abrasio).
(Dimensionen in n Mol/g Frischgewicht)

1) Werte von BEERMANN (1973), persönl. Mitteilung

Die Frage, ob diese Ergebnisse den in vivo-Verhältnissen entsprechen, kann im Zusammenhang mit der Arbeit von BEERMANN (1973) näher erläutert werden. BEERMANN hat im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit die gleichen Metabolit-spiegel im Corneaepithel bestimmt, das mit Hilfe des Frierstopverfahrens präpariert wurde. Einen Überblick über die mit den verschiedenen Präparationsmethoden ge-wonnenen Metabolitspiegel zeigt Tab. 11.

Aus früheren Arbeiten von REIM, SCHMIDT und MEYER und REIM, CATTEPOEL, MEYER (1965) und (1967) ist bekannt, daß die energiereichen Phosphatverbindungen ihren Metabolitstatus ganz erheblich ändern, wenn das Epithel einfach durch Abrasio präpariert wird im körperwarmen Zustand. Wenn das Frierstopverfahren nach REIM u. SCHMIDT angewandt wird, erhält man einen wesentlich höheren ATP-ADP-Quotienten, der nach Überlegungen von HOHORST, KREUTZ u. BÜCHER (1959) eher dem in vivo-Status der Metabolite entsprechen dürfte.

BEERMANN hat nun auch das Glutathion und die hier erörterten Metabolite analysiert und kam zu etwas abweichenden Werten. Insbesondere war beim Frierstopverfahren der absolute Glutathionspiegel nicht so hoch wie nach einfacher Abrasio des Corneaepithels. Auch lag der Quotient GSH/GSSG nur bei 10. Indessen ist durch gleichzeitige Bestimmungen von ATP und ADP gesichert worden, daß hier zumindest im Hinblick auf glykolytische Metabolite und Adenosinphosphate in vivo-Bedingungen vorlagen. Der ATP-ADP-Quotient bei BEERMANN's Untersuchungen betrug 10,5.

BEERMANN fand ein wesentlich geringeres NADPH als wir, nämlich nur 235 n Mol/g im Gegensatz zu 612 bei uns. Die NADP-Werte lagen etwa in gleicher Höhe. Auffallend ist, daß beim Frierstopverfahren das Glucose-6-Phosphat wesentlich niedriger liegt als nach Abrasio in vivo. Das sind Befunde, die schon früher bekannt waren (REIM, SCHMIDT u. MEYER).

Aus den vorliegenden Betrachtungen ist also zu entnehmen, daß die Reaktionen des Hexosephosphat-Shunt und der Glutathionreduktase bei den hier im Gewebe festgestellten NADP- und NADPH-Spiegeln gut funktioniert, d. h. mit seinen Reaktionen dem Massenwirkungsgleichgewichtszustand angenähert ist. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion ist als diejenige anzusehen, die das reduzierte Triphosphopyridinnucleotid erzeugt, also eine Reaktion, die die reduzierende Kraft für die Glutathionreduktase bereitstellt. Die Glutathionreduktase mit ihrem Reaktions-

gleichgewicht ganz auf Seiten des GSH wiederum wird alles angebotene NADPH zur Reaktion von GSSG verwenden.

Aus den vorliegenden Reaktionsgleichgewichten ist zu schließen, daß GSSG im Gewebe vorkommt, wenn auch in kleinen Mengen. Die Reduktion von GSSG wird wahrscheinlich bei Gewebsläsionen, wie der einfachen Abrasio zur Präparation des Epithels, verstärkt, weil der Umsatz über die Glucose-verbrauchenden Reaktionen erheblich ansteigt. Wir erkennen die Zunahme dieser Reaktionen am Anstieg des Glucose-6-Phosphat-Spiegels. Eine Zunahme des G-6-P-Spiegels und des F-6-P und des FDP-Spiegels ist immer zu beobachten, wenn die Reaktionen über die Glykolyse beschleunigt werden. Dementsprechend ist zu vermuten, daß bei einem angehobenen G-6-P-Spiegel auch die Reaktionen über den Hexosephosphat-Shunt schneller ablaufen, so daß mehr NADPH zur Reduktion von GSSG zur Verfügung steht. Wir haben also bei Gewebspräparationen, die nicht das Frierstopverfahren oder ähnliche Methoden anwenden, immer anzunehmen, daß noch während der Präparation oder im Homogenat eine Reduktion des GSSG auftritt.

Dementsprechend haben auch alle Voruntersucher praktisch kein GSSG gefunden, sondern nur GSH. Keiner der Untersucher in früheren Arbeiten hat ein Frierstopverfahren oder ähnliche Präparationsmethoden, die den in vivo-Status fixieren, angewandt. Wir glauben nach unseren Gleichgewichtsberechnungen, daß das GSSG auch in vivo vorkommt und als Reaktionspartner der Glutathionreduktase seine physiologische Bedeutung hat. Bei einem Versagen der NADPH-Produktion, z.B. bei Substratverarmung des Corneaepithels, wie es bei längerer Lagerung der Cornea vorkommt, sieht man dann auch einen Anstieg des GSSG zu Gunsten des GSH (CATTEPOEL, 1972). Hingegen ist es bisher im Experiment nicht gelungen, durch irgendwelche oxydierenden Metabolite das GSH/GSSG-System zu Gunsten des GSSG aus dem Gleichgewicht zu bringen, solange die Reaktionen des Hexosephosphat-Shunt ablaufen können. Die Anwesenheit von ASC und DHA im Corneaepithel läßt den Schluß zu, daß das Hexose-

phosphat-Glutathion-System auf die Weise, wie wir es einleitend auf S. 7 in Abb. 1 dargestellt haben, arbeitet. Es kann hervorgehoben werden, daß ASC und DHA im Epithel, Stroma und Kammerwasser gefunden wurde. Dieses könnte bedeuten, daß das wahrscheinlich nicht enzymatische ASC-DHA-System im extra- und intrazellulären Milieu gleich gut arbeitet, während die enzymatische Reaktion des Glutathion an die Zelle gebunden ist. Das durch Dehydroascorbinsäure oder Peroxyde oxydierte Glutathion wird, solange genügend Substrate anwesend sind und die Enzymkette des Hexosephosphat-Glutathion-Systems arbeitet, sofort reduziert.

Weitere Untersuchungen müssen zum Ziel haben, die Oxydation der Glucose über den Hexosephosphat-Shunt zu bremsen, um die Stabilität des GSH zu überprüfen, oder durch verstärktes Angebot von Dehydroascorbinsäure oder Peroxyden die Reduktion des GSH auszuschalten. Es handelt sich hier sicher um ähnliche Mechanismen, wie sie in den Erythrozyten vorliegen, über die ja ausgedehnte Arbeiten des Arbeitskreises von LOWHR, v. WALLER u. von BEUTLER vorliegen. Möglicherweise handelt es sich bei den Erythrozyten und dem Corneae epithel auch um verwandte Systeme, nur daß im Corneae epithel die spontane Oxydation durch Gegenwart von Luftsauerstoff die Ursache von Peroxydbildungen ist, wogegen in Erythrozyten die hochgesättigten Hämoglobineiweißkörper die Sauerstoffwirkung hervorrufen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Wir bestimmten in den einzelnen Kompartimenten der Rindercornea sowie im Kammerwasser die Konzentrationen von oxydiertem und reduziertem Glutathion, von Gesamtascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure, von Ascorbinsäure, von Glucose-6-phosphat und 6-Phosphogluconat sowie von oxydiertem und reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid.

Die Konzentrationen der Ascorbinsäure wurden mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt und miteinander verglichen, was gewisse Aussagen über die Spezifität der verwandten Untersuchungsmethode erlaubte.

Die Frage, ob unsere Ergebnisse den in vivo-Verhältnissen entsprechen, wurde durch den Vergleich mit Werten aus der Literatur, denen andere Präparations- und Analyseverfahren zugrunde lagen, und durch den Energiestatus des Adenosinphosphat-Systems erläutert.

Die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten und der Redoxpotentiale zeigte, daß die Reaktionen der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der Glutathion-Reduktase im Corneaepithel unter optimalen Bedingungen ablaufen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- ANDERSON, E.I. u.
A. SPECTOR: Oxidation-reduction reactions
involving ascorbic acid and the
hexosemonophosphate shunt in corneal
epithelium.
Invest. Ophthalm. Vol. 10, Nr. 1,
41-53 (1971)
- AONO, H.: Elektron microscopical studies on the
cornea.
Fol. Ophthalm. jap. 12, 331-337 (1961a)
In: ROHEN, Handbuch der mikroskopischen
Anatomie des Menschen III/4, 64
- BERNT, E. u.
H.U. BERGMAYER: Glutation.
In H.U. Bergmeyer Edit. Methoden der
enzymatischen Analyse, Bd. II,
Verlag Chemie, Weinheim, S. 1605-1609
(1970)
- BEUTLER, E.: The haemolytic effect of Primaquine and
Related Compounds on Red Blood Cells.
Review. Blood 14, 103-112 (1959)
- CALMETTES, L.,
F. DEODATI,
H. PLANEL et
P. BEC: Etude histologique et histochimique
de l'épithélium antérieur de la cornée
et de ses basales.
Arch. Ophthalm. (Paris) 16, 481 (1956)
- DAISLEY, K.W.: Synthesis of glutathione by normal
and X-irradiated lens.
Biochem. J. 60, x1 (1955)
- DELBRÜCK, A.: Untersuchungen über Enzyme des
Energiestoffwechsels im Bindegewebe.
Klin. Wschr. 40, 677-684 (1962)
- DIKSTEIN, S. and
D.M. MAURICE: in preparation (1969)
In: MAURICE, D.M. and M.V. RILEY:
The Cornea.
In: Biochemistry of the eye.
ed. by C.N. Graymore 1-101
Academic press New York / London
(1970)

- DONN, A.,
D.M. MAURICE
and N.L. MILLS: Studies on the living cornea in vitro.
II. The active transport of sodium
across the epithelium.
Arch. Ophthal. Chicago 62, 748-757 (1959)
- DUKE-ELDER, Sir St.
and A.G. LEIGH: The healing of the corneal epithelium.
System of Ophthalmology.
Vol. VIII, part 2, 604-614
ed. by Sir St. DUKE-ELDER, Henry
Kimpton, London (1965)
- DUKE-ELDER, W.S.
and E.S. PERKINS: The transparency of the cornea.
Blackwell Sci. Publ., Oxford (1960)
- FÜRSTER, K.H.: Über die Verteilung der Metabolite des
energieliefernden Stoffwechsels in
der Rindercornea unter besonderer
Berücksichtigung der Substantia propria.
Inaugural-Diss., Marburg (1969)
- FRIEDENWALD, J.S.,
W. BUSCHKE and
H.O. MICHEL: Arch. Ophthal., N.Y., 29, 535 (1943)
In: PIRIE, A., Ascorbic acid content
of cornea.
Biochem. J. 40, 96 (1946)
- HANNA, C. and
J.E. O'BRIEN: Cell production and migration in the
epithelial layer of the cornea.
Arch. Ophthal., N.Y. 64, 536 (1960)
Zit. von MAURICE in "The Eye"
Edit. Davson, Acad. Press, London /
New York (1962)
- HENNIGHAUSEN, W.U.: Enzymaktivitäten und Metabolitspiegel
in der Cornea verschiedener Spezies.
Inaugural-Diss., Marburg (1972)
- HERRMANN, H.
and F.H. HICKMAN: Exploratory studies on the corneal
metabolism.
Bull. Johns-Hopkins-Hosp. 82,
225-250 (1948)
- HERRMANN, H.
and F.H. HICKMAN: Further experiments on corneal
metabolism in respect to glucose
and lactic acid.
Bull. Johns-Hopkins-Hosp. 82,
260-272 (1948)

- HERRMANN, H.
and S.G. MOSES: Content and state of glutathione in the tissues of the eye.
J. Biol. Chem. 158, 33-45 (1945)
- HEYNINGEN, R. van
and A. PIRIE: Reduction of glutathione coupled with oxidative decarboxylation of malate in cattle lens.
Biochem. J. 53, 436-444 (1953)
- HOHORST, H.J.,
F.H. KREUTZ
and M. REIM: Steady state equilibria of some DPN-linked reactions and the oxidation/reduction state of the DPN/DPNH system in the cytoplasmatic compartment of liver cells in vivo.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 159-162 (1961)
- HOHORST, H.J.,
F.H. KREUTZ and
Th. BÜCHER: Über Metabolitgehalte und Metabolit-Konzentrationen in der Leber der Ratte.
Biochem. Z. 332, 18-46 (1959)
- JAKUS, M.A.: The fine structure of the human cornea.
In: The structure of the eye.
Edit. G.K. Smelser, Academic Press
New York / London (1961), S. 343-366
- JAKUS, M.A.: The fine structure of certain ocular tissues.
4. Int. Kongress für Elektronenmikroskopie 1958, Verhandlungen, Herausgegeben.: Bergmann, Möllenstedt, Niehrs, Peters, Ruska, Wolpers.
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York (1960) S. 334
- JOHNSON, S.W.: Biochem. J. 30, 1430 (1936)
In: PIRIE, A., Ascorbic acid content of cornea.
Biochem. J. 40, 96 (1946)
- KARLSON, P.: Kurzes Handbuch der Biochemie.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1967)
- KAYE, G.I.: Studies on the cornea.
III. The fine structure of the frog cornea and the uptake and transport of colloidal particles by the cornea in vivo.
J. Cell. Biol. 15, 241-258 (1962)

- KAYE, G.I. and
G.D. PAPPAS: Studies on the cornea.
I. The fine structure of the rabbit
cornea and the uptake of colloidal
particles by the cornea in vivo.
J. Cell. Biol. 12, 457-479 (1962)
- KINSEY, E.V. and
F.C. MERRIAM: Studies on the crystalline lens.
II. Synthesis of glutathione in the
normal and cataractous rabbit lens.
Arch. Ophthal. (Chic.) 44, 370-380
(1950)
- KLINGENBERG, M.: Nicotinamid-adenin-dinucleotide
(NAD, NADP, NADH, NADPH).
Spektrometrische und fluorimetrische
Verfahren.
In: H.U. Bergmeyer, Edit. Methoden der
enzymatischen Analyse, Bd. II, Verlag
Chemie, Weinheim, S. 1975-2004 (1970)
- KRIMSKI, I. and
E. RACKER: Glutathione, a prosthetic group of
glyceraldehyde-3-phosphate-dehydro-
genase.
J. Biol. Chem. 198, 721 (1952)
- KRUEGER, R.: Tagg. Dtsch. Ophthal. Ges. Heidelberg
(1959)
In: K. Lang, Ascorbinsäure.
Vorträge und Diskussionen des II.
Symposiums in Mainz v. 2.-3. April 1964
Dr. Dietrich Steinkopff-Verlag,
Darmstadt (1965), S. 141
- LEINFELDER, P.J.: Aerobic glycolysis of corneal tissue.
Tr. Am. Ophth. Soc. 46, 412 (1948)
In: ROETHH, de, A., Glycolytic
activity of the cornea.
Arch. Ophthal. Chic. 45, 139-148 (1951)
- LLOYD, D. and
H. SINCLAIR: In C.N. Bourne, Biochemistry and
Physiology of Nutrition I,
New York (1953)
In: K. LANG, Ascorbinsäure.
Vorträge und Diskussionen des II.
Symposiums in Mainz v. 2.-3. April 1964
Dr. Dietrich Steinkopff-Verlag,
Darmstadt (1965), S. 29
- LÖHR, G.W. and
H.D. WALLER: Biochemie und Pathogenese der enzymope-
nischen hämolytischen Anämien.
Dtsch. Med. Wschr. 86, 27-42 (1961)

- MAURICE, D.M.: The cornea and sclera.
In: "The Eye", Edit. Davson, Acad.
Press, London / New York (1962)
- MAURICE, D.M. and
A. GIARDINI: Swelling of the cornea in vivo after
the destruction of its limiting layers.
Brit. J. Ophthal. 35, 791-796 (1951)
- MÜLLER, H.K.: Nature, Lond. 132, 280 (1933)
In: PIRIE, A., Ascorbic acid content of
cornea.
Biochem. J. 40, 96 (1946)
- NORDMANN, J.: Le pouvoir-tampon d'oxydation-réduction
du cristallin.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 112, 1515-1518
(1933)
- NORDMANN, J.: Études physico-chimiques sur le
cristallin normal et pathologique.
Arch. Ophthal. (Paris) 52, 78-114,
170-209 (1953)
- NORDMANN, J.: Biologie du cristallin.
Masson & Cie., Paris (1954)
- NORDMANN, J. et
H. VERTRUYEN: Le pouvoir-tampon d'oxydation-réduction
du cristallin après action de
l'ascorbinase.
C.R. Soc. Biol. (Paris) 128, 410-411
(1938)
In: H. THOMANN, Chromatographische
Untersuchungen über Sulfhydrylgruppen
der Linse.
Albrecht v. Graef. Arch. klin. exp. Ophthal.
169, 85-93 (1966)
- PEDLER, C.: The fine structure of corneal epithelium.
Exp. Eye Res. 1, 286 (1962)
- PIRIE, A.: Glutathione Peroxidase in Lens and
Source of Hydrogen Peroxide in
Aqueous Humour.
Biochem. J. 96, 244-253 (1965)
- PIRIE, A.: Ascorbic acid content of cornea.
Biochem. J. 40, 96 (1946)

- RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie.
Lehrbuch für Studierende und Ärzte.
VEB Verlag Volk und Gesundh. Berlin,
S. 620-622 (1969)
- REIM, M.: Untersuchungen über Enzymaktivitäten
und Metabolitgehalte des energie-
liefernden Stoffwechsels der Hornhaut.
Habil.-Schrift, Marburg (1966)
- REIM, M.,
U. HENNIGHAUSEN,
D. HILDEBRANDT
and R. MAIER: Enzyme Activities in the Cornea
Epithelium and Endothelium of
Different Species.
Ophthal. Res. 2, 171-182 (1971)
- REIM, M. und
H. LICHT: Beziehungen zwischen Energiestoff-
wechsel und Hornhauttrübung.
Graef.Arch. Ophthal. 168, 365-377 (1965)
- REIM, M. und
D. MEYER: Über Veränderungen von Metabolitgehalten
im Corneaepithel in Anaerobiose.
Albrecht v. Graef. Arch.klin.exp.
Ophthal. 174, 103-109 (1967)
- REIM, M.,
D. MEYER und
H. CATTEPOEL: Über die Bedeutung des Frierstop-
verfahrens für den in vivo-Status der
Metabolite im Corneaepithel.
Albrecht v. Graef. Arch.klin.exp.
Ophthal. 174, 97-102 (1967)
- REIM, M. und
F.W. SCHMIDT: Biochemische Veränderungen bei der
Vereisung der Hornhaut in vivo.
Ein Beitrag zur Kältetherapie.
Klin. Mbl. Augenheilk. 150, 96-103
(1967)
- REIM, M.,
F.W. SCHMIDT und
D. MEYER: Die Metabolite des energieliefernden
Stoffwechsels im Hornhautepithel
verschiedener Säugetiere.
Ber. Dtsch. Ophthal. Ges. Heidelberg
67, 164-171 (1965)
- RILEY, M.V.: Aerobic glycolysis in the ox cornea.
Exp. Eye Res. 8, 201-204 (1969)
- ROHEN, J.W.: Das Auge und seine Hilfsorgane.
Handbuch der mikroskopischen Anatomie
des Menschen. Bd. III: Haut und
Sinnesorgane, 4. Teil.
Springer Verlag, Berlin, Göttingen,
Heidelberg, New York (1964)

- SCHIRMER, R.: Med.Klin. 48, 959 (1953)
In: K. LANG, Ascorbinsäure.
Vorträge und Diskussionen des II.
Symposiums in Mainz v. 2.-3. April 1964
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darm-
stadt (1965), S. 141
- STAUBESAND, J.: Zum Feinbau des Corneaendothels.
Verh. Anat. Ges. 57, Verlg. Hamburg,
1961b, Erg.Bd. Anat. Anz. III, 394
(1962)
- STAUBESAND, J.: Pinozytose und Permeabilität markiert
durch Gold- und Fe III Sole.
Verh. Anat. Ges. 57, Vers. Hamburg,
Anat. Anz. Suppl. III, 393 (1962b)
- STEWART, C.P.,
D.B. HORN and
J.S. ROBSON: Biochem. J. 53, 254 (1953) /
Proc. Nutrit. Soc. 12, 300 (1953)
In K. LANG, Ascorbinsäure.
Vorträge und Diskussionen des II.
Symposiums in Mainz v. 2.-3. April 1964
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag,
Darmstadt (1965) S. 29
- STÖHR, Ph., W. von
MÖLLENDORFF und
K. GOERTTLER: Lehrbuch der Histologie und der
mikroskopischen Anatomie des Menschen.
VEB G. Fischer Verl., Jena
S. 511-513 (1963)
- STROHECKER, R.
und H.M. HENNING: Vitamin-Bestimmung. Erprobte Methoden.
Herausg.: E. MERCK AG., Darmstadt,
Verl. Chemie, Weinheim, 248-252 (1963)
- SULLMANN, H. and
A.E. SCHMIDT: Ophthalmologica 103, 150 (1942)
In: PIRIE, A.: Ascorbic acid content
of cornea.
Biochem. J. 40, 96 (1946)
- TENG, C.C.: The fine structure of the corneal
epithelium and basement membrane
of the rabbit.
Amer. J. Ophthal. 51, 278 (1961)
- VIRCHOW, H.: Mikroskopische Anatomie der äußeren
Augenhaut und des Lidapparates.
Handbuch der ges. Augenheilk., 2. Aufl.,
I. Bd., Herausg.: Th. SAEMISCH,
I. Abt., W. Engelmann, Leipzig (1910)

- WALLER, H.D.: Aus: Erbliche Stoffwechselkrankheiten.
S. 74 ff., (München, 1962)
In: K. LANG, Ascorbinsäure.
Vorträge und Diskussionen des II.
Symposiums in Mainz v. 2.-3. April 1964
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag,
Darmstadt (1965) S. 140
- WEIMAR, V.L.: The transformation of corneal stromal
cells to fibroblasts in corneal
wound healing.
Amer. J. Ophthal. 44, 173-180 (1957)
In: ROHEN, Handbuch der mikroskopischen
Anatomie des Menschen. III/4 (1964)
- WOLBACH, S.B.: Amer. J. Path. 9, Suppl., 689 (1933)
In: PIRIE, A., Ascorbic acid content
of cornea.
Biochem. J. 40, 96 (1946)
- YAMAMOTO, M.: Morphological studies on the retinal
pigment epithelium and visual cell.
I. Frog's retina.
Acta Soc. Ophthal. jap. 59, 122-125
(1955a)
In: ROHEN, Handbuch der mikroskopischen
Anatomie des Menschen. III/4 (1964)

METHODISCHER ANHANG

Epithel Nr.	ASC _{ges.}
----------------	---------------------

1	4543
2	3779
3	2218
4	5761
5	4158
6	6520
7	8902
8	7720
9	8503
10	7120
11	6134
12	4316
13	6996
14	6920
15	2878

Epithel Nr.	DHA
----------------	-----

1	506
2	434
3	633
4	667
5	659
6	501
7	397
8	426
9	485
10	678

Tab. 12:

Einzelwerte des Gehaltes
an ASC_{ges.} (ASC + DHA)
im Epithel der Rinder-
cornea in n Mol/g
Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Tab. 13:

Einzelwerte des Gehaltes
an DHA im Epithel der
Rindercornea in n Mol/g
Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Epithel Nr.	GSH	GSSG	$\frac{\text{GSH}}{\text{GSSG}}$	GSH + 2 GSSG
1	3360	1422	2,36	6204
2	1960	1073	1,83	4106
3	4410	1433	3,09	7276
4	3540	1321	2,89	6182
5	2730	1552	1,76	5836
6	1790	1349	1,32	4488
7	3240	936	3,46	5112
8	4270	1362	3,14	6992
9	4380	973	4,50	6326
10	3270	1217	2,68	5704
11	2750	1306	2,11	5362
12	3020	1162	2,53	5344
13	3170	801	3,95	4772
14	3680	1120	3,29	5920
15	3840	1172	3,28	6184
16	4490	848	5,29	6186
17	5010	1034	4,86	7078
18	3600	1194	3,02	5988
19	6800	847	8,15	8494
20	3440	858	4,01	5156

Tab. 14:

Einzelwerte des Gehaltes an GSH und GSSG im Epithel
der Rindercornea in n Mol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Stroma Nr.	GSH	GSSG	GSH + 2 GSSG
1	o	25,43	50,86
2	o	26,74	53,48
3	o	29,93	59,86
4	o	21,01	42,02
5	o	26,29	52,58
6	o	16,87	33,74
7	o	23,23	46,46
8	o	23,65	47,30
9	o	25,27	50,54
10	o	24,28	48,56
11	o	33,21	66,42
12	o	53,88	107,76
13	o	33,50	67,00
14	o	27,79	55,58
15	o	25,03	50,06

Tab. 15:

Einzelwerte des Gehaltes an GSH und GSSG im
Stroma der Rindercornea in n Mol/g Frischge-
wicht (10^{-9} Mol)

Kammer- wasser Nr.	ASC ges.
1	992
2	741
3	911
4	897
5	1134
6	799
7	833
8	976
9	912
10	967
11	979
12	884
13	761
14	1109
15	693

Tab. 16:

Einzelwerte des Gehaltes
an ASC_{ges} (ASC + DHA)
im Kammerwasser des
Rinderauges in n Mol/g
Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Kammer- wasser Nr.	DHA
1	76
2	58
3	58
4	79
5	64
6	104
7	58
8	52
9	71
10	67

Tab. 17:

Einzelwerte des Gehaltes
an DHA im Kammerwasser
des Rinderauges in
n Mol/g Frischgewicht
(10^{-9} Mol)

Epithel Nr.	G-6-P	6-PG	NADP	NADPH
1	651	53	-	567
2	633	48	127	1036
3	449	20	108	461
4	468	42	157	572
5	498	18	150	452
6	955	81	134	570
7	854	67	116	428
8	1368	86	71	529
9	878	72	109	695
10	841	36	143	731
11	549	42	110	565
12	881	42	110	707
13	657	50	109	644
14	606	42	140	563
15	500	34	180	655

Tab. 18:

Einzelwerte des Gehaltes an G-6-P, 6-PG, NADP
und NADPH im Epithel der Rindercornea in n Mol/g
Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Kammer- wasser Nr.	ASC ges.
1	992
2	741
3	911
4	897
5	1134
6	799
7	833
8	976
9	912
10	967
11	979
12	884
13	761
14	1109
15	693

Tab. 16:

Einzelwerte des Gehaltes
an ASC_{ges} (ASC + DHA)
im Kammerwasser des
Rinderauges in n Mol/g
Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Kammer- wasser Nr.	DHA
1	76
2	58
3	58
4	79
5	64
6	104
7	58
8	52
9	71
10	67

Tab. 17:

Einzelwerte des Gehaltes
an DHA im Kammerwasser
des Rinderauges in
n Mol/g Frischgewicht
(10^{-9} Mol)

Epithel Nr.	G-6-P	6-PG	NADP	NADPH
1	651	53	-	567
2	633	48	127	1036
3	449	20	108	461
4	468	42	157	572
5	498	18	150	452
6	955	81	134	570
7	854	67	116	428
8	1368	86	71	529
9	878	72	109	695
10	841	36	143	731
11	549	42	110	565
12	881	42	110	707
13	657	50	109	644
14	606	42	140	563
15	500	34	180	655

Tab. 18:

Einzelwerte des Gehaltes an G-6-P, 6-PG, NADP
und NADPH im Epithel der Rindercornea in n Mol/g
Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Stroma Nr.	ASC _{ges.}
1	234
2	332
3	268
4	194
5	406
6	496
7	242
8	329
9	247
10	237

Stroma Nr.	DHA
1	123
2	201
3	81
4	293
5	105
6	265
7	226
8	105
9	137
10	184

Tab. 19:

Einzelwerte des Gehaltes
an ASC_{ges.} (ASC + DHA)
im Stroma der Rindercornea
in n Mol/g Frischgewicht
(10⁻⁹ Mol)

Tab. 20:

Einzelwerte des Gehaltes
an DHA im Stroma der
Rindercornea in
n Mol/g Frischgewicht
(10⁻⁹ Mol)

M e i n e a k a d e m i s c h e n L e h r e r
w a r e n d i e H e r r e n P r o f e s s o -
r e n u n d D o z e n t e n :

Amon, Bernhardt, Castenholz, Dimroth, Engelhardt,
Fischer, Haas, Hennis, Hering, Heuser, Höhl, Horn,
Hort, Janke, Karlson, Koecke, Korb, Kühnel, Mahr,
Mann, Niemeyer, Nöth, Petry, Pfütz, Riecken, Rohen,
Rosemann, Rupec, Salfeld, Schmidt, Schmitz-Moormann,
Schnell, Schiff, Seidel, Stuke, Walcher, Wendt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Reim
für die Überlassung des Themas, für die Einweisung
in die Methodik und für seine Hilfe bei der Abfas-
sung des Textes.

Der biologisch-technischen Assistentin, Frau H.
Cattapoel, sowie der medizinisch-technischen Assisten-
tin, Frau M. Ursprung, möchte ich für Rat und Unter-
stützung in allen technischen Schwierigkeiten danken.
Mein Dank gilt auch Herrn Prochazka für das Zeichnen
der Abbildungen und Herrn Ross, der die photogra-
phische Darstellung dieser Zeichnungen übernahm.
Herrn Dr. Dr. Wandt und dem Schlachthofpersonal wur-
de an entsprechender Stelle im Text gedankt.

Lebenslauf

Am 1.6.1949 wurde ich, Fritz Georg Peter Luthe, als Sohn des Dipl.Ing. Fritz Luthe und seiner Ehefrau Susanne Luthe, in Mittweida/Sa. geboren.

Von 1956 bis 1958 besuchte ich die Polytechnische Oberschule in Mittweida/Sa. und von 1958 bis 1964, bedingt durch einen Umzug nach Gera/Thür., die dortige Schule.

Im September 1964 trat ich in die Erweiterte Oberschule in Gera/Thür., ein.

Am 20. Januar 1968 verließ ich die DDR.

An der Ricarda-Huch-Schule in Gießen erlangte ich am 2.10.1968 die Hochschulreife.

Das Studium der Zahnmedizin begann ich im Wintersemester 1968/69 an der Philipps-Universität Marburg, bestand nach zwei Semestern das Vorphysikum und nach drei weiteren Semestern das Physikum.

